靶向B细胞并特异结合其分泌IL-10的重组融合蛋白的构建、表达和初步鉴定

Construction, expression and identification of recombinant fusion protein specifically targeting B cells and binding to IL-10

赵荣 陈含宇 黄春 章晓联 潘勤**

（武汉大学基础医学院免疫学系，病毒学国家重点实验室，湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室，湖北武汉 430071）

摘要 目的：CD19 单链抗体可变区（single-chain fragment variable）scFv 能特异性识别结合 B 细胞表面的 CD19 分子，白细胞介素-10（interleukin-10，IL-10）是调节性 B 细胞（Breg）的主要特征之一。这篇文章旨在构建 CD19scFv 和 IL-10 受体 1（IL-10R1）胞外段的重组融合蛋白，拟用该融合蛋白捕捉和封闭 Breg 细胞分泌的 IL-10。**方法**：CD19scFv 和 IL-10R1 胞外段克隆到 pET-28a 原核质粒上，*E. coli* BL21（DE3）工程菌表达蛋白通过镍柱富集和纯化蛋白，SDS-PAGE 和 Western Blot 对表达蛋白进行鉴定，pull down 实验验证蛋白与 CD19 分子和 IL-10 细胞因子的结合。**结果**：成功表达 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白,该融合蛋白能在体外同时结合 CD19 和 IL-10 分子。**结论**：CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白在体外可以同时结合 CD19 分子和 IL-10 分子，具有潜在应用前景可作为特异性抑制 Breg 的生物小分子。

[Abstract] **Objective**: CD19 scFv (single-chain fragment variable) specifically recognizes CD19 molecule expressed on the B cells surface. Interleukin-10 (IL-10) -producing B cells are a major subset of regulatory B cells (Breg). The aim of this study is to construct a recombinant fusion protein of CD19 scFv and IL-10 receptor1 (IL-10R1), which potentially captures and blocks IL-10 secreted by Breg cells. **Methods**: CD19scFv and IL-10R1 were cloned into pET-28a prokaryotic plasmid. Recombinant proteins were enriched and purified by Ni column, identified by SDS-PAGE and Western Blot. Pull down analysis was performed to identify the proteins captured by CD19scFv-IL-10R1 recombinant protein. **Results**: The CD19 scFv-IL-10R1 fusion protein is prepared and the protein binds to both CD19 and IL-10 molecules *in vitro*. **Conclusion**: CD19scFv-IL-10R1 fusion protein binds to both CD19 molecule and IL-10 molecule *in vitro*, and has potential application as a specific inhibitor for Bregs.

关键词：IL-10、调节性 B 细胞、IL-10 受体 1、CD19 单链抗体可变区

[Keywords] IL-10；regulatory B cells；IL-10R1；CD19-scFv

引言[1]

IL-10 作为抗炎因子在 1989 年被发现，IL-10 是重要的免疫调节性细胞因子，它的生物学功能主要是限制炎症反应，调节免疫细胞的分化和增殖, IL-10 作为免疫抑制因子不仅可以诱导外周耐受和免疫抑制，而且在免疫调节中起关键作用[1]。很多细胞可以产生 IL-10，包括 T 细胞亚群、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞等。最近研究表明，B 细胞也可以分泌 IL-10，分泌 IL-10 的 B 细胞是 Breg 的一个主要亚群，能负性调控免疫应答[2]。IL-10 通过与细胞表面的 IL-10 受体（IL-10R）结合发挥作用。人类和小鼠的 IL-10 受体（IL-10R）由 IL-10R1 和 IL-10R2 两个亚单位组成，两个亚单位均属于Ⅱ 型细胞因子受体家族。IL-10R1 是 IL-10R 中与 IL-10 结合的亚单位，T 淋巴细胞表面、巨噬细胞表面表达较高水平 IL-10R1。IL-10R2 不与 IL-10 发生结合，其胞内段含信号传导基序，介导信号传导[3]。

CD19 作为 B 细胞表面的标志分子，是细胞表面的跨膜蛋白，从骨髓祖 B 细胞开始表达，持续整个 B 细胞成熟期直至浆细胞消失，参与 BCR 识别抗原的过程。CD19scFv 能特异性识别结合 B 细胞表面的 CD19 分子[4]。在本研究中将首次构建 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白，该蛋白能同时结合 CD19 和 IL-10 分子。期望该融合蛋白能特异性靶向 B 细胞，进而捕获 Breg 细胞分泌的 IL-10，从而发挥特异性封闭 Breg 细胞的作用。本研究构建了 pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 重组表达质粒，并表达和纯化了 CD19scFv-IL-10R1 重组蛋白，最后对该重组蛋白的功能进行了初步的评估。

1 材料方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞和细菌：大肠杆菌 *E. coli* DH5a，*E. coli* BL21（DE3）由本实验室保存。4-6 周龄雄性 C57/B6 野生型小鼠(SPF 级别) ，小鼠购买于武汉大学 A3 动物实验中心。

1.1.2 试剂、仪器：pET-28a 载体由本室保存，质粒提取试剂盒（AXYGEN），割胶回收试剂

[1] [1] 收稿日期 2017-07-28 修回日期 2017-11-06
国家自然科学基金(81471910， 31370197，21572173，31770145)，湖北省医学领军人才计划（523-276003），湖北省技术创新专项（2016ACA150，2016CFA062，2015CFA009），武汉市科技晨光计划（2016070204010127）。
**通讯作者，电子信箱 panqincn@whu.edu.cn

盒（AXYGEN），DNA Ligation Kit- Ligation High （TOYOBO），*Bam*HⅠ、*Hind*III、*Xho*Ⅰ限制性内切酶购于Promega公司，1640培养基购买于Gbico公司，anti-IL-10、anti-CD19购买于SANTA CRUZ，IL-4、GM-CSF（粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子）购于SANTA CRUZ，his抗体购于protein tech，Trizol购于Invitrogen。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠CD19scFv基因的克隆 根据 文献[5]序列设计克隆引物，CD19scFv sense primer: 5' CAGGATCCATGGACATTCAGCTGACC 3' 含*Bam*HⅠ酶切位点，CD19scFv antisense primer: 5' ATAAGCTTCATGGTTCCTGGGCC 3' 含 *Hind*III 酶切位点，以pcDNA3.1-myc-his-SE2-scFv（本实验室保存）为模板进行扩增，反应条件如下：预变性95 ℃ 4 min；变性95 ℃ 20 s；退火 58 ℃ 20 s；延伸72 ℃ 30 s；最后72 ℃延伸3 min；共30个循环。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后，按照说明书割胶回收，回收后用限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Hind*III 37 ℃双酶切2 h，酶切产物按照割胶回收试剂盒回收。pET-28a空载质粒用 *Bam*HⅠ、*Hind*III 37 ℃双酶切2 h后，与前述处理的PCR产物混合，进行连接反应，转化，涂Kan^+（卡那霉素）抗性板，挑取阳性克隆提质粒酶切鉴定，酶切鉴定成功的质粒送擎科公司用载体通用引物（公司提供）测序。

1.2.2 小鼠CD19scFv-IL-10R1 基因的克隆 根据IL-10R1 （GI:374272206）序列设计克隆引物。IL-10R1: sense primer：5' GCAAGCTTATGCTAGAATTCATTGCA 3' 含*Hind*III酶切位点 ，IL-10R1 anti sense primer：5' ATATCTCGAGGATGCTCAGGTTGGTC 3'含 *Xho*Ⅰ酶切位点，取野生型C57BL/6小鼠的骨髓细胞用GM-CSF（20 ng/mL）、IL-4（10 ng/mL）诱导其向树突状细胞（DC）分化，诱导培养6天。收集细胞用Trizol法提取细胞的RNA，逆转录为 cDNA，以cDNA为模板进行PCR扩增，反应条件如下预变性95 ℃ 4 min；变性95 ℃ 20 s；退火 50 ℃ 20 s；延伸72 ℃ 30 s；最后72 ℃延伸3 min；共30个循环。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后，按照说明书割胶回收，回收产物*Hind*III、*Xho*Ⅰ酶切消化并克隆入pET-28a-CD19scFv载体（图1），经过Kan^+抗性板筛选，挑取阳性克隆提质粒酶切鉴定，鉴定成功的质粒送擎科公司用载体通用引物（公司提供）测序。

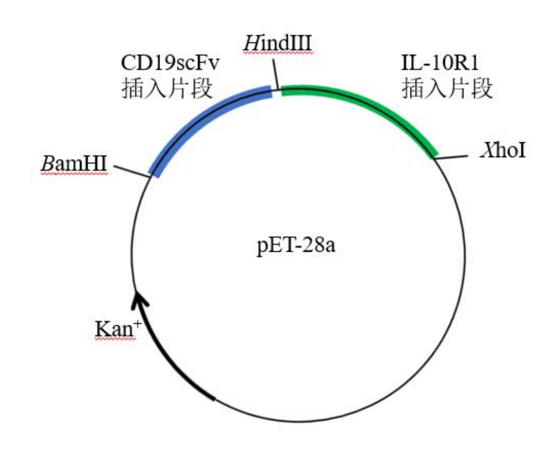


图 1 pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 的构建。

Fig.1 Construction of pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 plasmid.

1.2.3 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白的表达纯化　将克隆成功的质粒转化 *E. coli* BL21（DE3）大肠杆菌菌株。挑取单克隆，在 5 mL LB 培养基中，含 Kan+抗生素（50 ng/mL）培养过夜；将过夜的菌液 1:100 加入 1000 mL LB 培养基中，培养至 OD_{600} ＞ 0.6，加入终浓度 800 μmol/L 的 IPTG，继续培养 6 h。在不同的诱导温度（4 ℃、16 ℃、25 ℃ 、30 ℃），不同的 IPTG 诱导浓度（0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、1 mM、1.25 mM、2 mM），诱导重组蛋白的表达。培养完成后于 4 ℃、10000 g、离心 5 min 收集菌体。用 PBS 洗一次菌体，将得到的细菌沉淀完全重悬于 50 mL 预冷的 lysis buffer 中，高压菌质仪碎菌，低温高速离心，将得到的蛋白上清与镍柱冰上结合 2 h，并用不同的浓度的咪唑洗脱液（20 mM、40 mM、60 mM、80 mM、100 mM、200 mM）500 μl 将携带 His-tag 的蛋白从镍柱上洗脱， 得到融合蛋白后用 SDS PAGE 跑胶和考马斯亮蓝染色，验证表达的重组蛋白。

1.2.4 Western Blot 检测 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白表达　上述纯化的蛋白取 10 μL 的蛋白与等体积的 2 x SDS 上样缓冲液混匀，95 ℃干浴锅处理 10 min。 SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜 2 h；5 %脱脂牛奶 37 ℃ 封闭 2 h；小鼠 his 抗体 1：3000 稀释，37 ℃孵育 1 h；HRP-羊抗鼠 IgG 37 ℃孵育 1 h；ECL（电化学发光液）显色。

1.2.5 Pull down 实验检测融合蛋白与小鼠 CD19 和 IL-10 分子的结合　无菌条件下取出小鼠脾脏，制取单个细胞悬液用 AKT（150 mM NH_4Cl、10 mM $KHCO_3$、0.1 mM DETA 裂解红细胞）处理后制成单细胞悬液，用终浓度 30 IU/mL 的 IL-2 和 10 μg/ML 的 LPS 刺激脾细胞 72-96 h 后，收集细胞。RIPA 裂解液冰上处理 30 min，300 g/5 min 离心取上清。CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白、CD19scFv 蛋白和 IL-10R1 蛋白原核表达后与镍柱冰上结合 2 h，结合了蛋白的镍柱与脾细胞 RIPA 裂解液 4 ℃过夜，镍柱反复洗涤去除未结合的分子，

样品进行 Western Blot，一抗分别为 anti-IL-10 和 anti-CD19 抗体。

2 结果

2.1 CD19scFv 和 IL-10R1 编码基因片段的获得 为了获得 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白，我们首先以 pcDNA3.1-myc-his-SE2-scFv 为模板，PCR 扩增，获得 CD19scFv 编码目的蛋白的基因片段。得到 CD19scFv 目的基因扩增产物后，琼脂糖凝胶电泳确认 CD19scFv DNA 片段大小，在 700bp 附近，与预期相符。

为了获得 IL-10R1 的目的基因，我们取野生型 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞用 GM-CSF、IL-4 诱导 DC 细胞。收集细胞用 Trizol 法提取细胞的 RNA，逆转录 cDNA，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到 IL-10R1 目的基因扩增产物，琼脂糖凝胶电泳确认 IL-10R1 DNA 片段大小，在 700bp 附近，与预期相符。

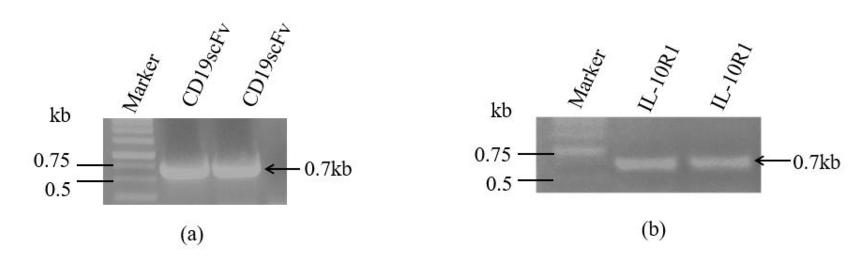


图 2 CD19scFv 和 IL-10R1 编码基因片段 PCR 产物的鉴定。

Fig.2 Identification of PCR products of CD19scFv and IL-10R1 gene fragments.

(a) Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of CD19scFv (b) Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of IL-10R1

2.2 pET-28a-CD19scFv、pET-28a-CD19scv-IL-10R1 克隆和鉴定 我们先将 CD19scFv 割胶回收产物插入到 pET-28a 质粒中，将连接重组质粒转化 *E.coli* DH5a，获得的单克隆，提取质粒并进行 *Bam*H Ⅰ、*H*indⅢ 37 ℃ 酶切消化，其产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果如图 3(a)，酶切产物中含有 0.7 kb 的插入片段。鉴定成功的质粒送公司测序，测序结果正确。

接着，我们将 IL-10R1 目的基因插入 pET-28a-CD19scFv 质粒中，获得 pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 重组质粒，我们也对重组质粒 pET-28a-CD19scv-IL-10R1 质粒进行了鉴定图 3（b），琼脂糖凝胶电泳结果显示有 1.4 kb 的插入片段，鉴定成功的质粒送公司测序，测序结果正确。

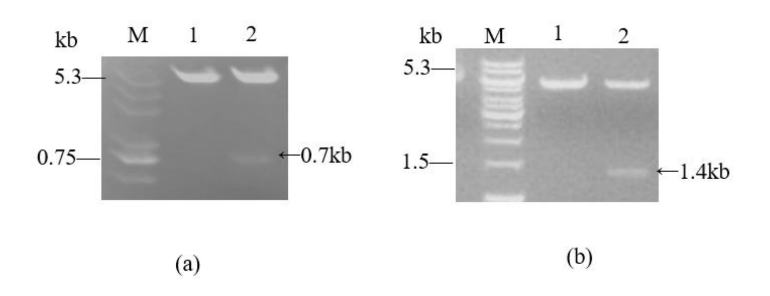


图 3　pET-28a-CD19scFv 和 pET-28a-CD19scv-IL-10R1 克隆双酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定。

Fig.3 Identification of pET-28a-CD19scFv plasmid **(a)and** pET-28a-CD19scv-IL-10R1 plasmid **(b).**

(a) pET-28a-CD19-scfv plasmid was treated with *B*amHI and *H*indIII. Lane 1, pET-28a ; Lane 2, digestion with *B*amHI and *H*indIII　(b) Lane 1, pET-28a ; Lane 2, digestion with *B*amHⅠ and *X*hoⅠ

2.3 CD19scFv 和 CD19scFv-IL-10R1 重组蛋白的表达以及表达条件的优化　有文献[6]报道过 CD19scFv 蛋白的表达方案，参照以上方法我们表达并纯化了 CD19scFv 蛋白（图 4)。

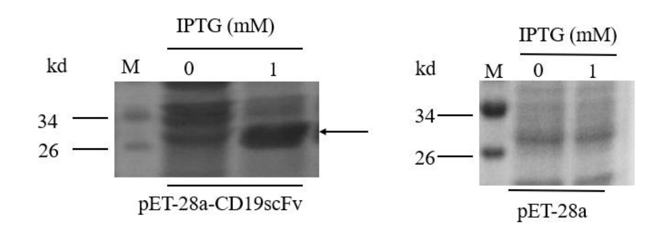


图 4　25 ℃诱导 CD19scFv 蛋白表达结果。

Fig. 4 Expression of CD19scFv protein at 25 ℃.

2.4 在本研究中，我们着重优化了 CD19scFv-IL-10R1 蛋白的表达方案。pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 转化 *E.coli* BL21（DE3） 大肠杆菌菌株。挑取单克隆，在不同诱导温度（4 ℃、16 ℃、25 ℃、30 ℃）和不同 IPTG 浓度（0.4 mM-2 mM）下表达蛋白。如图 5 所示，温度条件对蛋白诱导结果的影响大，IPTG 浓度差异对蛋白表达几乎没有影响。16 ℃和 4 ℃温度条件下， CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白有明显的预期分子量条带出现，且表达量在 4 ℃条件下表达更多。25 ℃和 30 ℃诱导温度下没有明显的诱导条带出现。

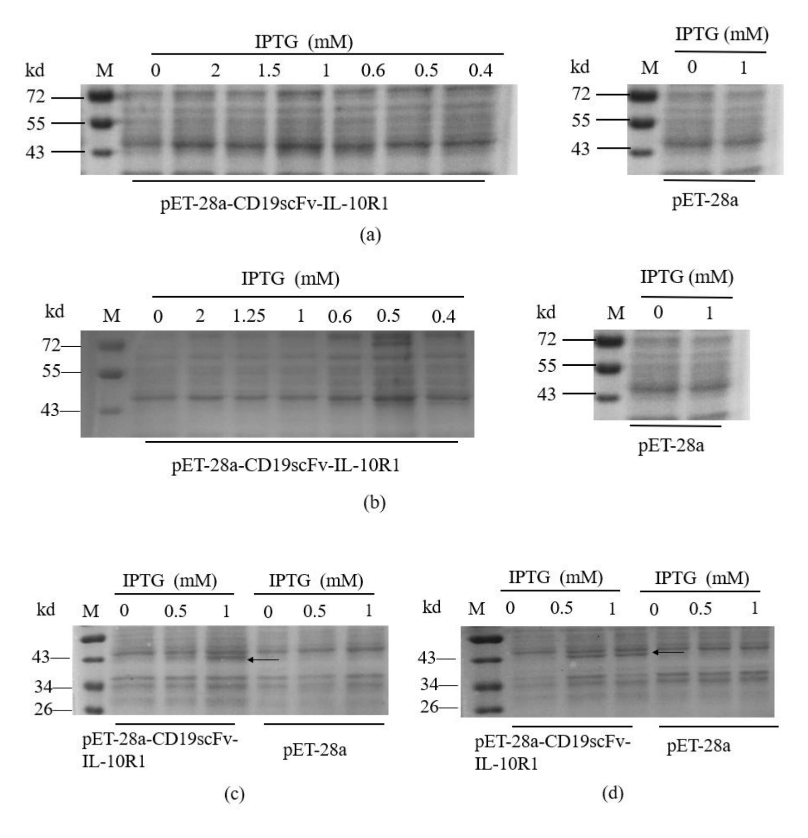


图 5 不同温度和不同 IPTG 浓度诱导温度下蛋白诱导表达结果。

Fig.5 Expression of CD19scFv-IL-10R1 protein at different temperatures and different IPTG concentrations. (a) at 30 ℃; (b) at 25 ℃; (c) at 16 ℃; (d)at 4 ℃

(a) CD19scfv-IL-10R1 was expressed at 30 ℃ and (0.4 mM-2 mM) IPTG concentrations (b) CD19scfv-IL-10R1 was expressed at 25 ℃ and (0.4 mM-2 mM) IPTG concentrations (c) CD19scfv-IL-10R1 was expressed at 16 ℃ and (0.4 mM-2 mM) IPTG concentrations (d) CD19scfv-IL-10R1 was expressed at 4 ℃ and (0.4 mM-2 mM) IPTG concentrations

2.5 CD19scFv 和 CD19scFv-IL-10R1 重组蛋白的纯化 pET-28a-CD19scFv 和 pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 转化 *E.coli* BL21（DE3） 大肠杆菌。在 25 ℃条件下诱导 pET-28a-CD19scFv 表达，在 4 ℃条件下诱导 pET-28a-CD19scFv-IL-10R1 蛋白表达。碎菌后得到的蛋白上清与镍柱结合，用不同浓度的咪唑洗脱液（20 mM、40 mM、60 mM、80 mM、100 mM、200 mM）洗脱镍柱，收集洗脱下来的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析（图 6 a）。跑胶结果显示 40 mM 和 60 Mm 浓度的咪唑洗脱液洗脱能获得较高浓度的蛋白。随后 Western Blot 分析进一步证实了用镍柱收集纯化的目的蛋白 CD19scFv 和 CD19scFv-IL-10R1（图 6 b）。

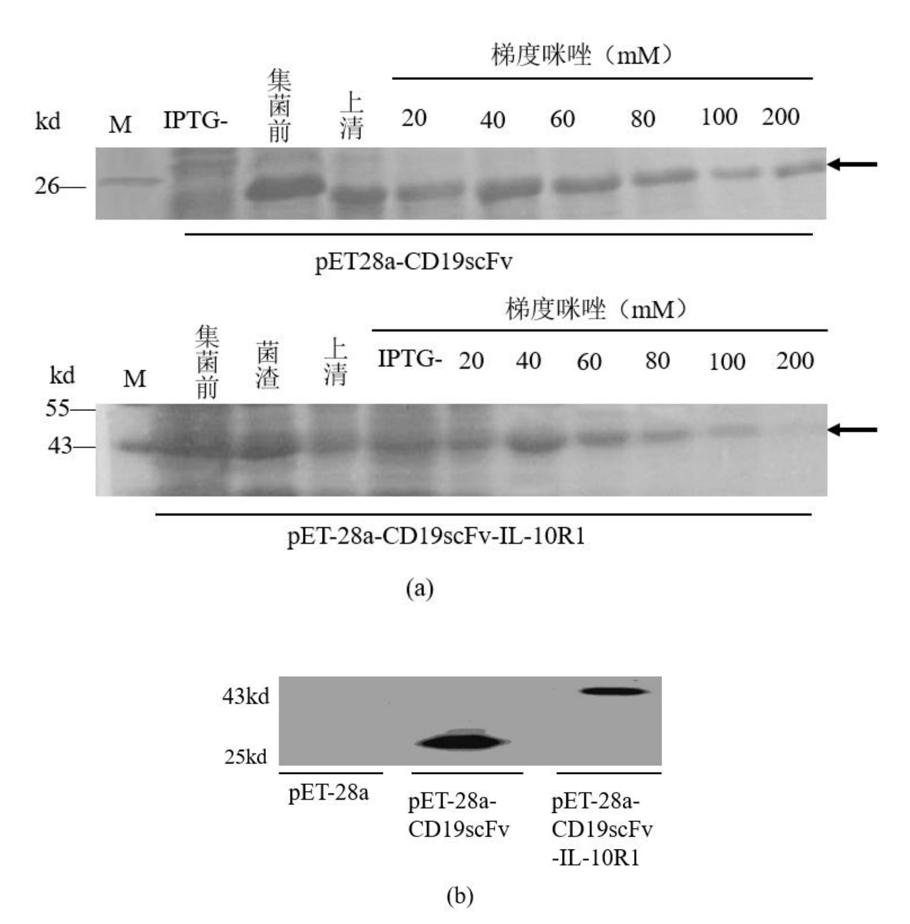


图 6 CD19scFv 和 CD19scFv-IL-10R1 重组蛋白纯化结果 SDS-PAGE 和 Western Blot 验证。

Fig. 6 Determination of purified CD19scFv and CD19scFv-IL-10R1 recombinant protein by SDS PAGE and Western blot

(a) SDS PAGE (b) Western blot

2.5 CD19scFv-IL-10R1 重组蛋白能同时结合 CD19 和 IL-10 分子 CD19scFv 和 CD19scFv-IL-10R1 蛋白分别和镍柱结合。取小鼠脾细胞，用 LPS 刺激，参照文献[7]方法诱导脾脏 B 细胞分泌 IL-10。结合蛋白的镍柱与脾细胞裂解液 4 ℃孵育过夜。随后离心，反复洗涤镍柱除去未结合蛋白。样品做 Western Blot，用 anti-IL-10 和 anti-CD19 抗体检测融合蛋白是否可以同时结合 CD19 和 IL-10 分子。如图 7 所示， CD19scFv-IL-10R1 在体外能同时结合 CD19 和 IL-10 分子，CD19scFv 只能结合 CD19。此结论说明了融合蛋白 CD19scFv-IL-10R1 在体外可以同时和 CD19 分子和 IL-10 分子结合。

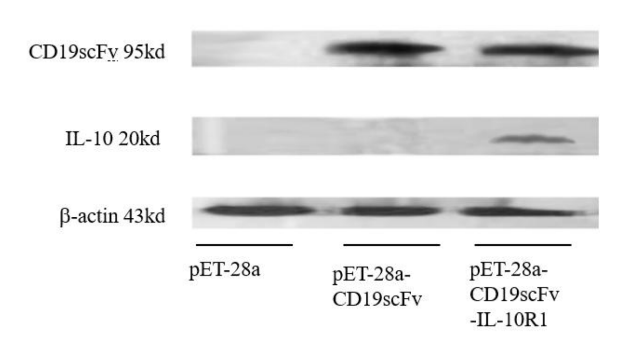


图 7 CD19scfv-IL-10R1 能同时结合 CD19 和 IL-10 分子。

Fig. 7 CD19-scfv-IL-10R1 binds to both CD19 and IL-10.

CD19scfv-IL-10R1/ CD19scFv-beads were incubated with cell lysate from LPS-treaded B splenocytes. After washing the beads, Western Blot was performed to identify the proteins captured by CD19scfv-IL-10R1/ CD19scFv-beads.

讨论：

本文主要对 CD19scFv-IL-10R1 融合蛋白的原核诱导表达条件进行了摸索，尝试了不同的温度条件和不同的 IPTG 浓度条件，从文中图 4 的结果发现不同的温度对蛋白的诱导表达影响大，而 IPTG 浓度对蛋白的诱导表达影响不明显。16 ℃和 4 ℃诱导温度下目的蛋白条带明显，但稍高温度诱导蛋白表达不明显，考虑到的原因可能是蛋白不稳定，温度高容易降解。为了确定最佳温度的诱导条件，我们将在下一步工作中对蛋白表达进行不同温度下同时诱导，并在同一块 SDS PAGE 胶上看不同温度下的蛋白表达的差异,以确定最优蛋白诱导温度。

CD19 是靶向 B 细胞治疗的一个标志分子，因为它只在正常或恶性 B 淋巴细胞表面表达,几乎不在其他细胞表达；且在 B 细胞恶性转化过程中不丢失。CD19 的 scFv-单链抗体可变区能特异性的与 B 细胞表面的 CD19 分子结合，CD19scFv 与其他蛋白融合不仅可使融合蛋白特异性的靶向 B 细胞，还能发挥 B 细胞的效应功能。最近的研究报道基因工程蛋白 hCD80/anti-CD19scFv(双功能蛋白抗 CD19/B7) 保留了其特异性的 CD19 抗原结合活性，CD19 阳性的急性 B 淋巴细胞白血病患者的原代肿瘤细胞,在体外经双功能蛋白抗 CD19/B7 修饰后,可诱导化疗后的自体淋巴细胞活化,继而特异性杀伤自体肿瘤细胞[8]。

IL-10 主要发挥免疫抑制功能，通过与细胞表面的 IL-10R 受体结合发挥作用。融合蛋白 CD19scFv-IL-10R1 可以和 CD19 和 IL-10 分子结合，能特异性结合 B 细胞并且捕获 B 细胞分泌的 IL-10 ，从而达到特异性封闭 Breg 细胞功能的作用。从本文的 pull down 结果可见，融合蛋白 CD19scFv-IL-10R1 可以和 CD19 和 IL-10

分子体外结合。研究表明 Breg 细胞可以促进肿瘤的发生发展，这种作用通过 IL-10 介导，有研究发现 IL-10 可以抑制 Th1 和 Th2 表达 [9]，在小鼠乳腺癌 4T1 模型中，CD19 $^{+}$ B220 $^{+}$ CD25 $^{+}$B2 淋巴细胞作为 Breg 亚群之一，对乳腺癌细胞肺部转移发挥促进作用 [10]。在肿瘤中，Breg 可以通过抑制 T 细胞的功能，减弱机体的抗肿瘤免疫[8]。本文中克隆的融合蛋白 CD19scFv-IL-10R1 则具有潜在的抑制 Breg 功能的作用。我们期望 CD19scFv-IL-10R1 能作为新型的抗肿瘤制剂，或是免疫调节剂，通过抑制 Breg 的功能来达到抗肿瘤或是增强细胞免疫的目的。

参考文献

［1］ Sabat R, Grutz G, Warszawska K, et al．Biology of interleukin-10. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(5): 331-344.

[2] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d hi CD5 + phenotype controls T cell dependent inflammatory responses. Immunity, 2008，28(5)：639-650.

[3] Jurlander J, Lai CF, Tan J, et al. Characterization of interleukin-10receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, 1997, 89 (11): 4146-4152.

[4] Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. Science, 1992, 256(5053): 105–107.

[5] Yuan-Qin Min. Targeting of Envelope Protein E2 Antigen to B Cells via CD19-Scfv for HCV Vaccine Design[A]. 病毒学国家重点实验室、武汉大学、中国科学院武汉病毒研究所、湖北省科学技术协会，第五届武汉现代病毒学国际研讨会论文集[C]，病毒学国家重点实验室、武汉大学、中国科学院武汉病毒研究所、湖北省科学技术协会，2013:1.

[6] Ma Y, Xiang D, Sun J, et al. Targeting of antigens to B lymphocytes via CD19 as a means for tumor vaccine development. Immunol, 2013, 190(11): 5588-5599.

[7] Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. Immunol, 2009, 182(12): 7459-7472.

[8] Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving for-ward. Natl Cancer Inst, 2012, 104: 599–613.

[9] Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, et al. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on

expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. Cancer Immunol Immun, 2013, 62(1): 87-99.

[10] Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, et al. Tumor evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4 + T cells to T-regulatory cells. Cancer Res, 2011, 71(10): 3505-3515.